



REC'D 31 OCT 2003
WIPO PCT

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

19 AOUT 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

#### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIETE  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr





INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

1er dépôt

BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété Intellectuelle - Livre VI

BR1  
N° 11354\*02

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 & W / 010801

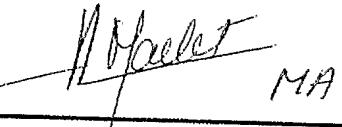
REMISE DES PIÈCES DATE		Réservé à l'INPI	
LIEU <b>26 JUIL 2002</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>13 INPI MARSEILLE</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI <b>0209506</b> DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>26 JUIL. 2002</b>		<b>■ NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> <b>À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b> <b>CABINET MAREK</b> <b>Pierre MAREK</b> <b>28 et 32 rue de la loge</b> <b>13002 MARSEILLE</b>	
Vos références pour ce dossier (facultatif) <b>B118 12FR 4</b>			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>■ NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date <input type="text"/>
		N°	Date <input type="text"/>
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		N°	Date <input type="text"/>
<b>3 TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)			
Anticorps d'isotypes particuliers anti antigènes d'excrétion sécrétion de promastigotes ou d'amastigotes de Leishmania sp			
<b>■ DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		<input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>■ DEMANDEUR</b> (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale	<input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		BIO VETO TESTS, en abrégé BVT	
Prénoms			
Forme juridique		SARL	
N° SIREN		[3 8 8 9 2 3 2 0 3]	
Code APE-NAF		<input type="text"/>	
Domicile ou siège	Rue	285, avenue de Rome - Parc d'activité Les Playes Jean Monnet Sud	
	Code postal et ville	[8 3 5 0 0] LA SEYNE SUR MER	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)		<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2<sup>me</sup> page

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**
**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES		Réervé à l'INPI
DATE		
LIEU <b>26 JUIL 2002</b>		
N° D'ENREGISTREMENT <b>13 INPI MARSEILLE</b>		
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI <b>0209506</b>		
08 540 6 W / 010801		
Vos références pour ce dossier : (facultatif)		
B118 12FR 4		
<b>6 MANDATAIRE</b> (s'il y a lieu)		
Nom <b>MAREK</b>		
Prénom <b>Pierre</b>		
Cabinet ou Société <b>CABINET MAREK</b>		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel <b>921167</b>		
Adresse	Rue	28 et 32 rue de la Loge
	Code postal et ville	<b>13002 MARSEILLE</b>
	Pays	<b>FRANCE</b>
N° de téléphone (facultatif) <b>04 91 91 57 54</b>		
N° de télécopie (facultatif) <b>04 91 90 94 71</b>		
Adresse électronique (facultatif) <b>marek.cabinet@wanadoo.fr</b>		
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes <input checked="" type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)		
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		
Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		
Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt		
<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		
Uniquement pour les personnes physiques		
<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) AG		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Pierre MAREK - Mandataire		
 <b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 		

5 Anticorps d'isotypes particuliers anti antigènes d'Excrétion Sécrétion de promastigotes ou d'amastigotes de *Leishmania* sp utilisés comme marqueurs de la protection, de la résistance et de la guérison des mammifères aux leishmanioses et aux infections à micro-organismes pathogènes intracellulaires, et comme effecteurs d'immunothérapie.

La présente invention concerne la détection et l'utilisation d'anticorps d'isotype IgG<sub>2</sub> spécifiques d'antigènes d'excrétion sécrétion de *Leishmania* permettant :

10 - la mise en évidence d'une immunité à médiation cellulaire dépendant de lymphocytes T de type Th1,

- le suivi de la réponse immune après vaccination ou traitement,

- l'évaluation de l'efficacité d'un traitement chimiothérapeutique et/ou immunothérapeutique, chez les mammifères et en particulier chez l'homme, les canidés, les félidés et les équidés,

15 - l'évaluation d'un état de résistance à la leishmaniose,

- l'établissement d'une immunothérapie.

La présente invention concerne également :

20 - la mise en évidence d'une réponse humorale spécifique représentée par des IgG d'isotype IgG<sub>2</sub> chez le chien et/ou d'autres isotypes chez d'autres mammifères, réponse humorale reliée à une réponse à médiation cellulaire dépendant de lymphocytes T de type Th1,

- la détection de ces IgG spécifiques du parasite *Leishmania* sp en utilisant des antigènes d'Excrétion Sécrétion (ES) parfaitement définis et

25 - le rôle neutralisant de ces IgG caractérisé par l'inhibition de la prolifération des formes amastigotes ou promastigotes de *Leishmania*.

30 Le complexe vaccinal thérapeutique constitué d'ES produits dans un milieu axénique et asérique défini tel que décrit dans la demande de Brevet d'Invention française N°01/07606 du 11 Juin 2001 induit une immunostimulation du système lymphocytaire de type Th1 assurant la mise en place d'une immunité protectrice. Cette immunité à médiation cellulaire qui se caractérise par une activation des lymphocytes et des macrophages et par la synthèse de cytokines spécifiques de la voie Th1, est reliée à une immunité humorale caractérisée par la production d'IgG spécifiques neutralisant d'isotypes particuliers.

On peut diviser de manière très schématique les réponses immunitaires en deux grandes catégories qualitativement distinctes, les réponses humorales qui mettent en jeu la production d'anticorps par les lymphocytes B, et les réponses cellulaires (réaction d'hypersensibilité retardée, réactions cytotoxiques) pour lesquelles les cellules effectrices sont des lymphocytes T. Il apparaît que dans la majorité des modèles expérimentaux et des situations cliniques étudiées, les cytokines d'origine lymphocytaire sont essentiellement produites par les cellules T auxiliaires CD4+ (ou helper) dont le rôle est de moduler ou de réguler l'immunité humorale et cellulaire et qui reconnaissent l'antigène en association avec les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité. Un concept majeur a émergé en 1985 lorsque T. Mosmann et R. Coffman ont proposé que les cellules lymphocytaires T CD4+ exprimant des fonctions auxiliaires étaient en fait hétérogènes. Ainsi, grâce à l'étude de clones lymphocytaires T CD4+ de souris, cultivés à long terme, ces auteurs ont décrit l'existence de deux sous-populations majeures que l'on peut distinguer grâce à leur profil de sécrétion de cytokines à savoir les cellules Th1 (pour T helper de type 1) et les cellules Th2 (pour T helper de type 2).

20 Prenons comme exemple la leishmaniose, qui est une infection parasitaire endémique voire épidémique de régions tropicales et subtropicales du monde. Les *Leishmania*, protozoaires flagellés de la famille des trypanosomatidae et du genre *Leishmania*, sont les agents pathogènes responsables de ces maladies.

25 Les nombreuses études portant sur les réponses immunitaires au cours des leishmanioses murines expérimentales ont conduit à la démonstration du rôle prépondérant de l'immunité à médiation cellulaire et de l'existence d'une dualité de la réponse immunologique. Il existe fondamentalement deux types de réponses à l'encontre des leishmanies : l'une qualifiée de « sensibilité », l'autre de « résistance ». C'est par le biais des lymphokines qu'elles sécrètent que les différentes sous-populations de lymphocytes T (CD4+) limitent ou exacerbent l'infection. Il a ainsi été démontré que la sous-population de lymphocytes T auxiliaires de type Th1 (producteur d'interféron gamma et d'interleukine 2) était capable d'éliminer les formes amastigotes intracellulaires par le biais de l'activation des macrophages (Reiner S.L et al., Annu Rev Immunol, 1995, 13, 151-177).

Review). Inversement, la sous-population de lymphocytes T auxiliaires de type Th2 (producteur d'interleukine 4) est responsable de l'exacerbation de la maladie.

5 Chez l'homme, certains faits sont de nature comparable. Chez le chien (hôte naturel « réservoir » réceptif au cycle évolutif de *L.infantum*), la dualité de la réponse immunologique existe vraisemblablement. Seule une étude menée par Pinelli et al. (Infect. Immun., 62 :229, 1994) sur des animaux expérimentalement et naturellement infectés par *L.infantum*, a permis de montrer que l'asymptomatisme du chien (état clinique fréquemment rencontré) s'accompagnait de l'absence d'une 10 réponse humorale et du développement d'une immunité à médiation cellulaire de type Th1 avec une réaction d'hypersensibilité de type retardée positive et des taux élevés d'interleukine 2 et de TNF- $\alpha$  circulant dans les liquides biologiques.

15 La polarisation des réponses immunitaires vers un phénotype Th1 ou Th2 a été associée à de nombreuses situations pathologiques.

20 Pour les infections à *Leishmania*, *Trypanozoma*, *Candida* et autres organismes intracellulaires comme *Mycobacterium* et *Listeria* une réponse Th1 corrèle avec la résistance au pathogène.

La présente invention consiste notamment à détecter des anticorps dont la production accompagne la polarisation d'une immunité à médiation cellulaire vers une voie de type Th1.

25 Selon les spécialistes comme Pinelli (Pinelli.E et al. Infect. Immun, 1994, 62 :229-235) les chiens leishmaniens correspondant à l'activation du système lymphocytaire de type Th2 présentent une réponse anticorps élevée. Cette production accrue en anticorps correspond à une hyperprotéinémie et induit l'apparition d'immunocomplexes entraînant une atteinte rénale (augmentation de la 30 créatine et de l'urée sanguine).

35 Néanmoins, certains travaux préliminaires chez l'homme (KAWANO. P et al, Parasite Immunol, 1995, 17, 451-458) et chez le chien (NIETO C.G et al, Vet Immunol and Immunopathology, 1999, 67, 117-130) annoncent que les isotypes d'IgG seraient des marqueurs de la dichotomie immunitaire Th1/Th2.

5 Plus précisément, un chien atteint de leishmaniose avec des signes cliniques probants présente un taux élevé d'anticorps principalement d'isotype IgG<sub>1</sub> alors qu'un chien asymptomatique présente des anticorps spécifiques d'isotype IgG<sub>2</sub>. La spécificité de ces isotypes à un antigène parfaitement déterminé n'a jamais été établie.

10 10 Les chiens ayant reçu le complexe vaccinal thérapeutique décrit dans la demande de brevet d'invention française N° 01/07606 précitée présentent des taux significatifs d'IgG<sub>2</sub> spécifiques des protéines sécrétées, ce qui est conforme à l'expansion préférentielle de lymphocytes T de type Th1.

15 15 A contrario, les chiens ayant reçu un placebo ne présentent pas d'IgG<sub>2</sub> spécifiques.

20 20 La présente invention a également pour but de démontrer que les IgG<sub>2</sub> de chien reliés au système Th1 sont spécifiques d'un antigène parfaitement défini : les antigènes d'excrétion sécrétion de *Leishmania* (ES).

25 25 Ces IgG<sub>2</sub> de chien sont plus précisément spécifiques d'une protéine dénommée PSA « Protein Surface Antigen » qui est l'antigène majeur des antigènes ES libérés par les 2 stades parasitaires. La PSA présente un épitope « immunologiquement silencieux » lors d'une infection par des leishmanies chez l'homme ou le chien, cet épitope situé dans la région carboxyterminale conservée est reconnu par les IgG de chien. Cette zone d'antigènes majeurs a été caractérisée par l'élaboration d'anticorps monoclonaux (AMC). Deux banques d'expression d'ADNc des formes promastigotes et des formes amastigotes de *Leishmania* ont été criblées immunologiquement à l'aide de l'AMC F5 afin d'identifier les immunogènes majeurs des AES. Ceci a permis d'isoler l'ADNc d'un clone donné qui code une protéine excrétée sécrétée de la famille des PSA.

30

Ces protéines PSA présentent des domaines répétés riches en leucine caractéristiques.

35 35 L'analyse de la séquence ADNc du clone B3A révèle qu'il code pour une séquence peptidique correspondant exactement à l'extrémité COOH-terminale des PSA isolées (voir figure 1 : représentation schématique des différentes séquences

Plus précisément, un chien atteint de leishmaniose avec des signes cliniques probants présente un taux élevé d'anticorps principalement d'isotype IgG<sub>1</sub> alors qu'un chien asymptomatique présente des anticorps spécifiques d'isotype IgG<sub>2</sub>. La spécificité de ces isotypes à un antigène parfaitement déterminé n'a jamais été établie.

Les chiens ayant reçu le complexe vaccinal thérapeutique décrit dans la demande de brevet d'invention française N° 01/07606 précitée présentent des taux significatifs d'IgG<sub>2</sub> spécifiques des protéines sécrétées, ce qui est conforme à l'expansion préférentielle de lymphocytes T de type Th1.

A contrario, les chiens ayant reçu un placebo ne présentent pas d'IgG<sub>2</sub> spécifiques.

La présente invention a également pour but de démontrer que les IgG<sub>2</sub> de chien reliés au système Th1 sont spécifiques d'un antigène parfaitement défini : les antigènes d'excrétion sécrétion de *Leishmania* (ES).

Ces IgG<sub>2</sub> de chien sont plus précisément spécifiques d'une protéine dénommée PSA « Protein Surface Antigen » qui est l'antigène majeur des antigènes ES libérés par les 2 stades parasitaires. La PSA présente un épitope « immunologiquement silencieux » lors d'une infection par des leishmanies chez l'homme ou le chien, cet épitope situé dans la région carboxyterminale conservée est reconnu par les IgG de chien. Cette zone d'antigènes majeurs a été caractérisée par l'élaboration d'anticorps monoclonaux (AMC). Deux banques d'expression d'ADNc des formes promastigotes et des formes amastigotes de *Leishmania* ont été criblées immunologiquement à l'aide de l'AMC F5 afin d'identifier les immunogènes majeurs des AES. Ceci a permis d'isoler l'ADNc d'un clone donné qui code une protéine excrétée sécrétée de la famille des PSA.

Ces protéines PSA présentent des domaines répétés riches en leucine caractéristiques.

L'analyse des séquences ADNc révèle une séquence peptidique correspondant exactement à l'extrémité COOH-terminale des PSA isolées (voir

protéiques déduite des séquences d'ADN<sub>c</sub> des différents clones isolés reconnus par l'anticorps monoclonal F5).

5 Au moyen d'une protéine recombinante codant pour la partie carboxyterminale des PSA, il a été démontré que les patients ou les chiens atteints de leishmaniose sont incapables de produire des anticorps contre le ou les épitopes portés par la protéine recombinante (voir figure 2 : Analyse de la réponse humorale de patients et de chiens naturellement infectés vis à vis de la protéine recombinante 6(His)-COOH-PSA), alors qu'ils produisent des anticorps contre les antigènes ES 10 natifs, donc contre d'autres épitopes présents sur les PSA natives. Par contre les chiens immunisés avec les AES de promastigotes de *Leishmania infantum* présentent des anticorps d'isotype IgG2 spécifiques de la partie carboxyterminale (voir figure 3 : Analyse de la réponse humorale de chiens immunisés par des AES 15 de promastigotes de *Leishmania infantum* vis à vis de la protéine recombinante 6(His)-COOH-PSA)

20 La présente invention a également pour but de démontrer qu'après chimiothérapie ou immunothérapie, les IgG2 de chien spécifiques des antigènes ES de Leishmania et notamment de la partie carboxyterminale de la PSA apparaissent avec l'amélioration significative de l'état général de chiens atteints de Leishmaniose.

25 Comme toutes les maladies à transmission vectorielle, les leishmanioses se caractérisent par un cycle évolutif qui est relativement simple puisqu'il se partage entre deux hôtes, mammifères et insectes (phlébotomes) et comprend deux formes principales :

- une forme flagellée appelée promastigote, présente dans le tube digestif du vecteur phlébotome où il se multiplie avant d'acquérir sa forme infectante pour l'hôte mammifère, encore appelée métacyclique ;
- 30 - une forme non flagellée appelée amastigote, présente chez l'hôte mammifère dont le chien et l'homme.

35 Un autre but de l'invention est de mettre en évidence que les IgG<sub>2</sub> de chien reliés au système Th1 ont une activité neutralisante envers la prolifération des amastigotes et des promastigotes de *Leishmania sp.*

figure 1 : représentation schématique de l'extrémité COOH terminale des PSA reconnue par l'anticorps monoclonal F5).

5 Au moyen d'une protéine recombinante codant pour la partie carboxyterminale des PSA, il a été démontré que les patients ou les chiens atteints de leishmaniose sont incapables de produire des anticorps contre le ou les épitopes portés par la protéine recombinante (voir figure 2 : Analyse de la réponse humorale de patients et de chiens naturellement infectés vis à vis de la protéine recombinante 6(His)-COOH-PSA), alors qu'ils produisent des anticorps contre les antigènes ES natifs, donc contre d'autres épitopes présents sur les PSA natives. Par contre les 10 chiens immunisés avec les AES de promastigotes de *Leishmania infantum* présentent des anticorps d'isotype IgG2 spécifiques de la partie carboxyterminale (voir figure 3 : Analyse de la réponse humorale de chiens immunisés par des AES de promastigotes de *Leishmania infantum* vis à vis de la protéine recombinante 15 6(His)-COOH-PSA)

La présente invention a également pour but de démontrer qu'après chimiothérapie ou immunothérapie, les IgG2 de chien spécifiques des antigènes ES de *Leishmania* et notamment de la partie carboxyterminale de la PSA apparaissent avec l'amélioration significative de l'état général de chiens atteints de Leishmaniose.

20 Comme toutes les maladies à transmission vectorielle, les leishmanioses se caractérisent par un cycle évolutif qui est relativement simple puisqu'il se partage entre deux hôtes, mammifères et insectes (phlébotomes) et comprend deux formes principales :

25

- une forme flagellée appelée promastigote, présente dans le tube digestif du vecteur phlébotome où il se multiplie avant d'acquérir sa forme infectante pour l'hôte mammifère, encore appelée métacyclique ;
- 30 - une forme non flagellée appelée amastigote, présente chez l'hôte mammifère dont le chien et l'homme.

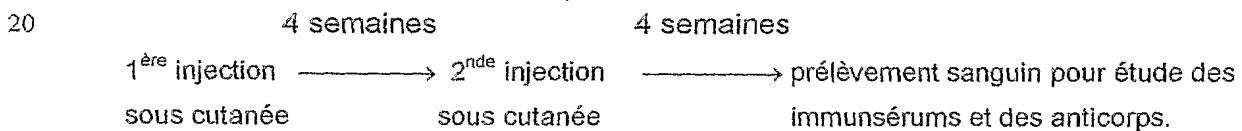
35 Un autre but de l'invention est de mettre en évidence que les IgG<sub>2</sub> de chien reliés au système Th1 ont une activité neutralisante envers la prolifération des amastigotes et des promastigotes de *Leishmania sp.*

5 Afin d'étudier la synthèse spécifique d'anticorps IgG<sub>2</sub> chez le chien, 2 types d'expériences sont effectués après immunisation par le complexe vaccinal thérapeutique constitué d'ES :

1. Rôle de l'effet « *in vitro* » d'immunsérum de chiens sur les cinétiques de multiplication des différents stades du parasite *Leishmania infantum*.
- 10 2. Dosage des IgG<sub>2</sub> spécifiques anti antigènes d'excrétion sécrétion de *Leishmania*.

15 Pour nos expériences, nous avons utilisé le complexe vaccinal composé d'antigènes d'excrétion sécrétion de promastigotes démontré dans la demande de brevet française N° 01/07606 susmentionnée.

Les chiens sont immunisés selon le schéma suivant :



25 Un autre type d'expérience est effectué : dosage des IgG<sub>2</sub> spécifiques anti antigènes ES de *Leishmania* chez des chiens leishmaniens traités par chimiothérapie. Pour cette expérience, nous avons utilisé, comme antigène, la protéine recombinante codant pour la partie carboxyterminale des PSA.

30 Les méthodes utilisées sont les suivantes :  
a. Matériel parasitaire :

35 La culture de promastigotes de *leishmania infantum* MON.1 est récoltée en phase stationnaire de croissance. Les parasites sont lavés 3 fois dans 15 ml de PBS stérile (centrifugation à 4°C à 5000 tours pendant 10 min) puis repris dans 1 ml de PBS.

La différenciation promastigote/amastigote et donc la multiplication des amastigotes nécessitent  $0,5 \cdot 10^6$  parasites par ml de milieux de culture MAA20 pH 5,8 en boîte de culture incubée à 37°C et sous 5% de CO<sub>2</sub> (conditions représentatives de l'environnement phagolysosomial) ; la prolifération des promastigotes nécessite  $10^6$  parasites par ml de milieux de culture RPMI 20% pH 7,2 en boîte de culture incubée à 25°C (conditions représentatives du phlébotome).

Un test de viabilité au bleu Trypan® à 0,4% en PBS ainsi qu'un comptage en cellule de Thomas doit être fait afin de resuspendre les parasites en PBS stérile tels qu'ils soient à  $10^6$ /ml.

10

b. Préparation des sérums :

15

Un aliquot de chaque sérum est décomplémenté par passage au bain-marie pendant 45 min à 56°C puis centrifugé 12 min à 12000 tours pour éviter les agglutinines.

Dans un premier temps, le taux sérique en anticorps n'étant pas connu, une gamme de dilution aléatoire est réalisée. Pour  $10^6$  parasites, il faut mettre en contact 20µl de sérum :

20

- 1<sup>er</sup> essai sérum pur :  $5 \cdot 10^6$  parasites (répartis en RPMI et MAA) soit  $(5 \cdot 10^6 \times 20) / 10^6 = 100 \mu\text{l}$  de sérum pur.
- 2<sup>ème</sup> essai dilution au 1/2 : 50 µl de sérum pur + 50 µl de Tampon PBS stérile.
- 3<sup>ème</sup> essai dilution au 1/4 : 25 µl de sérum pur + 75 µl de PBS stérile.
- 4<sup>ème</sup> essai dilution au 1/8 : 12,5 µl de sérum pur + 87,5 µl de PBS stérile

25

c. Contact Promastigotes –Anticorps :

30

Les contacts sont réalisés dans des tubes à eppendorff de 1,5 ml où  $5 \cdot 10^6$  parasites sont traités par 100 µl de sérum pendant 30 min sur la glace (temps minimum nécessaire à un promastigote pour infecter un macrophage). L'excès d'anticorps est ensuite lavé deux fois par 1 ml de PBS et par une centrifugation à 5000 tours de 10 min et cela à 2 reprises.

35

d. Analyses :

5 Un aliquot de 10µl de chaque essai est alors pris juste après contact pour réaliser un test de viabilité au bleu Trypan® et une numération en cellule de Thomas, l'excédent servant à la mise en culture à partir de laquelle un comptage est réalisé quotidiennement.

◦ **Prolifération des promastigotes (milieu RPMI 20%)**

10 Un comptage en cellule de Thomas à partir de chaque essai est réalisé quotidiennement pour suivre la cinétique de multiplication.

15 A partir d'un aliquot de chaque essai de culture, un frottis parasitaire fixé au méthanol puis coloré au May-Grunvald-Giemsa est réalisé quotidiennement où le pourcentage de forme promastigotes, sphéromastigotes et amastigotes est déterminé par le comptage de 100 parasites.

◦ **Prolifération des amastigotes (milieu MAA 20)**

20 A partir d'un second aliquot de chaque essai de culture, une numération en cellule de Thomas est effectuée afin de suivre la cinétique de multiplication.

Les calculs d'inhibition de croissance sont réalisés sur le modèle suivant :

Le nombre de parasites traités avec le sérum sain (= Ns) → 100% de croissance

25 Le nombre de parasites traités avec le sérum immunisé (=Ni) → x% de croissance

$$\% \text{ inhibition} = 100 - (Ni \times 100)/Ns$$

e. Etudes des anticorps :

30 Les anticorps totaux IgG des chiens antiLeishmania sont détectés par immunofluorescence classique utilisant des lames coatées par des promastigotes (méthode de référence sérologique pour la leishmaniose canine).

La détection des IgG2 spécifiques des ESP s'effectue par ELISA selon la technique de microtitration de Kweider et al (J.immunol, 1987, 138 :299) en utilisant les ESP comme antigènes et un conjugué anti IgG2.

5

f. Analyses effectuées :

Une étude complète d'inhibition de la prolifération des amastigotes et des promastigotes est effectuée sur 2 chiens :

10

Chienne MINON : Braque de Weymar femelle de 4 ans, vaccinée avec ESP

Chienne MUMA : Epagneul Breton, femelle de 7 ans, contrôle placebo

15

Un test de viabilité des promastigotes est effectué sur 6 autres chiens en étude expérimentale et 4 chiens en étude terrain (essai du complexe vaccinal ES en zone endémique) comparativement à 2 chiens témoins.

g. Etude des anticorps chez des chiens leishmaniens traités par chimiothérapie :

20

Pour la 3<sup>ème</sup> expérience, des sérums de 5 chiens atteints de leishmaniose viscérale et traités par du glucantime pendant 1 à 2 mois, provenant du Dr B ont été analysés.

25

Les anticorps totaux IgG des chiens anti Leishmania sont détectés par immunofluorescence et la détection des anticorps IgG2 spécifiques des ESP s'effectue par ELISA comme précédemment décrit (cf : e : étude des anticorps) mais en utilisant comme antigène la protéine recombinante codant pour la partie carboxyterminale des PSA.

30

**RESULTATS :**

*1. Etude sur la prolifération des promastigotes de *L.infantum* :*

35

• L'étude suivante est réalisée sur des parasites mis en contact avec un sérum de chien sain ou immunisé 4 fois avec des produits d'excrétion-sécrétion de promastigotes (ESP) et avant challenge.

5 Déterminée par un test au bleu Trypan®, la viabilité des promastigotes était de 100% avant contact avec le sérum. Après 30 min de contact, la viabilité avec le sérum sain était toujours de 100% à toutes les dilutions alors qu'avec le sérum immunisé aux ESP elle n'était plus que de 50% avec le sérum pur, 73% avec le sérum dilué au  $\frac{1}{2}$ , 92% et 94% avec respectivement le sérum dilué au  $\frac{1}{4}$  et  $\frac{1}{8}$  (voir figure 4 : Cinétiques de prolifération des promastigotes après 30 minutes de contact avec différentes dilutions de sérums (Pur (A) ;  $\frac{1}{2}$  (B) ;  $\frac{1}{4}$  (C) ;  $\frac{1}{8}$  (D)) de chien sain (S) Muma et immunisé avec des ESP (I) Minon).

10

Le tableau ci-après décrit l'évolution du pourcentage d'inhibition de la croissance des promastigotes après contact de 30 minutes avec sérum de chien immunisé (ESP) par rapport au sérum de chien sain.

Pourcentage d'inhibition	1 <sup>er</sup> jour	2 <sup>ème</sup> jour	3 <sup>ème</sup> jour	4 <sup>ème</sup> jour	Moyenne
I pur / S pur	93%	92%	98%	73%	89%
I $\frac{1}{2}$ / S $\frac{1}{2}$	94%	94%	84%	90%	90%
I $\frac{1}{4}$ / S $\frac{1}{4}$	79%	60%	45%	0%	46%
I $\frac{1}{8}$ / S $\frac{1}{8}$	ND	81%	90%	81%	84%

15

○ **Interprétation :**

20 L'inhibition de la croissance avec le sérum anti-ESP (chien MINON) par rapport au sérum sain approche les 90% quelle que soit la dose (mise à part pour la dilution au  $\frac{1}{4}$ , erreurs de manipulations ?). Il apparaît que la valeur seuil d'activité de ce sérum n'est pas atteint avec cette gamme de dilutions, du moins l'effet cytotoxique est puissant et la croissance des promastigotes est fortement ralenti à toutes les dilutions de sérums.

25

2. *Etude sur la prolifération des amastigotes de *L.infantum**

30 ○ L'étude suivante est réalisée sur les cultures en MAA.20 pour différenciation en amastigotes, de promastigotes traités avec un sérum d'avant challenge de chien sain ou immunisé 4 fois avec des ESP (voir figure 5 : Cinétiques de prolifération des amastigotes après 30 minutes de contact avec différentes

dilutions de sérum (Pur (A) ;  $\frac{1}{2}$  (B) ;  $\frac{1}{4}$  (C) ;  $\frac{1}{8}$  (D)) de chien sain (S) Mumu et de chien immunisé avec des ESP (I) Minon).

5 Le tableau ci-après indique les pourcentages d'inhibition de la multiplication des amastigotes après 30 minutes de contact avec sérum de chien immunisé (ESP) par rapport au sérum de chien sain :

% inhibition	1 <sup>er</sup> jour	2 <sup>ème</sup> jour	3 <sup>ème</sup> jour	Moyenne
I <sub>p</sub> /Sp	66%	68%	61%	65%
I $\frac{1}{2}$ / S $\frac{1}{2}$	47%	60%	42%	51%
I $\frac{1}{4}$ / S $\frac{1}{4}$	24%	47%	47%	39%
I $\frac{1}{8}$ / S $\frac{1}{8}$	15%	18%	24%	19%

• **Interprétations :**

10 Une inhibition de la croissance est constatée sur la cinétique de croissance des amastigotes lorsque avant différenciation les promastigotes ont été mis en contact avec un sérum anti-ESP. La croissance des amastigotes se trouve alors ralentie et cela de façon proportionnelle à la concentration de sérum. Plus le sérum du chien immunisé aux ESP est concentré, plus la multiplication des amastigotes se trouve inhibée. Il y a donc un effet de dose dépendance.

15 **3. Résultats obtenus sur d'autres chiens :**

20 La moyenne de viabilité des promastigotes après contact avec du sérum de chien immunisé par le complexe vaccinal ESP est de 16,8% (5 chiens vaccinés) et de 72,9% (5 chiens placebo) pour du sérum de chiens non immunisés. Aussi, des anticorps de chien immunisé non reliés au complément sont cytotoxiques pour les promastigotes.

25 Le tableau ci-après indique les pourcentages de viabilité des promastigotes après contact, avec des sérum de chiens immunisés et non immunisés avec les ESP.

Chiens analysés	T1* (Control)	T2* (Control)	Etudes expérimentales					
			E	O	G	K	7	16
			Placebo	Placebo	Vaccin	Vaccin	Vaccin	Placebo
Pourcentage de viabilité	100%	100%	85.7%	61.9%	22.4%	10.1%	12.8%	76.2%

Chiens analysés	T1* (Control)	T2* (Control)	Etudes sur le terrain			
			HC 046	HC 051	LB 120	RR 019
			Placebo	Vaccin	Placebo	Vaccin
Pourcentage de viabilité	100%	100%	66.7%	15.7%	73.8%	22.9%

5                   o     Chiens T1 et T2 : chiens sains non immunisés et n'ayant pas reçu de placebo.

4. Corrélation entre les anticorps de chien et l'effet des sérums sur la 10 viabilité des promastigotes

15                   Selon le tableau ci-dessous (Corrélation IgG2 anti ESP/inhibition prolifération des promastigotes), la baisse du pourcentage de viabilité des promastigotes correspond à la présence d'IgG2 spécifiques du complexe vaccinal ESP.

Chiens	MINON	MUMA	E	O	G	K	7	16
IgG totales Par IF*	-	-	-	-	-	-	-	-
IgG2 spécifiques de ESP** par ELISA	0.391	0.108	0.065	0.104	0.299	0.299	0.310	0.056
Pourcentage de viabilité	50%	100%	85.7%	61.9%	22.4%	10.1%	12.8%	76.2%

Chiens	HC 046	HC 051	LB 120	RR 019
IgG totales par IF*	-	-	-	-
IgG2 spécifiques de ESP** par ELISA	0.054	0.321	0.065	0.386
Pourcentage de viabilité	66.7%	15.7%	73.8%	22.9%

\* IF : Immunofluorescence : négative : taux  $\leq 1/100$

5                    \*\* IgG<sub>2</sub> : DO à 492 nm : les caractères gras correspondent à des résultats positifs

5.   Etude des IgG<sub>2</sub> chez des chiens leishmaniens traités par chimiothérapie :

10

Les 5 chiens leishmaniens présentaient au début du traitement un taux élevé en IgG totale ( $\geq 1/200$ ), ce taux restait fixe ou descendait à 1/50 4 mois après le début du traitement pour 4 chiens.

15

Le cinquième est décédé 2 mois après le traitement, il présentait une augmentation en IgG totales (1/200 au 1/800) et était négatif en IgG<sub>2</sub> dirigés contre la partie carboxyterminale des PSA.

20

Par contre, les 4 autres chiens guérissent et présentent des IgG<sub>2</sub> contre la partie carboxyterminale des PSA.

25

Il apparaît donc que la capacité à produire des anticorps IgG<sub>2</sub> contre cet épitope spécifique des PSA accompagne l'évolution vers la guérison des chiens. Ce sont donc bien les IgG<sub>2</sub> qui sont responsables de la lyse des amastigotes et promastigotes de *Leishmania sp* in vitro et de la neutralisation de leur prolifération.

L'analyse de sérums de 3 chiens leishmaniens traités par le complexe vaccinal ESP donne exactement le même type de résultat, c'est à dire une

apparition d'IgG<sub>2</sub> spécifiques (de la partie carboxyterminale des PSA des ESP) corrélant avec une activité du sérum neutralisant la prolifération des promastigotes de *Leishmania infantum* « in vitro » et une immunité à médiation cellulaire de type Th1.

5

10 Ces IgG<sub>2</sub>, chez le chien, ou autres isotypes particuliers chez les autres mammifères reliés à une immunité cellulaire de type Th1, sont détectables par diverses méthodes in vitro, par exemple : ELISA, DOT BLOT, WESTERN BLOT, IMMUNOCHROMATOGRAPHIE, IMMUNO NEPHELOMETRIE, RIA, IMMUNO PRECIPITATION, ELECTRO SYNERESE et tout autre méthode in vitro faisant intervenir un système de conjugué ou autres systèmes de visualisation de la réaction Ag-Ac. Il peut, par exemple, être utiliser un système ELISA sur support plastic et un système WESTERN BLOT sur membranes de nitrocellulose ou autres polymères faisant intervenir un conjugué enzymatique. Des supports de latex 15 peuvent également être conjugués par exemple à des radio-isotopes, des molécules fluorescentes, des molécules luminescentes ou des particules de couleur. Des colloïdes métalliques peuvent également être utilisés. Par ailleurs, les antigènes d'excrétion sécrétion d'amastigotes ou de promastigotes de *Leishmania sp* et plus particulièrement la partie carboxyterminale de la Protein Surface Antigen sous forme 20 purifiée ou protéine recombinante sont couplés à des grosses molécules de biotine, avidine, streptavidine ou tout autre protéine pour les rendre plus accessibles.

25 Ainsi, les anticorps d'isotype IgG2 selon l'invention peuvent être utilisés chez les mammifères comme marqueurs d'un état immunitaire de type à médiation cellulaire dépendante de lymphocytes T et préférentiellement de lymphocytes T de type Th1, comme marqueurs de la vaccination immunoprophylactique et immunothérapeutique pour les infections à micro-organismes pathogènes intracellulaires, et comme effecteurs d'immunothérapie pour les leishmanioses et les infections à micro-organismes pathogènes intracellulaires.

apparition d'IgG<sub>2</sub> spécifiques (de la partie carboxyterminale des PSA des ESP) corrélant avec une activité du sérum neutralisant la prolifération des promastigotes de *Leishmania infantum* « *in vitro* » et une immunité à médiation cellulaire de type Th1.

5

Ces IgG<sub>2</sub>, chez le chien, ou autres isotypes particuliers chez les autres mammifères reliés à une immunité cellulaire de type Th1, sont détectables par diverses méthodes *in vitro*, par exemple : ELISA, DOT BLOT, WESTERN BLOT, IMMUNOCHROMATOGRAPHIE, IMMUNO NEPHELOMETRIE, RIA, IMMUNO PRECIPITATION, ELECTRO SYNERESE et tout autre méthode *in vitro* faisant intervenir un système de conjugué ou autres systèmes de visualisation de la réaction Ag-Ac. Ainsi, les immunoglobulines selon l'invention peuvent être utilisées pour un produit de diagnostic permettant de détecter un ou des épitopes portés par les extrémités NH<sub>2</sub> et COOH terminales de la Protein Surface Antigen excretée sécrétée par *Leishmania sp*. Il peut par exemple être utilisé un système ELISA sur support plastic et un système WESTERN BLOT sur membranes de nitrocellulose ou autres polymères faisant intervenir un conjugué enzymatique. Des supports de latex peuvent également être utilisés. Des radio-isotopes, des molécules fluorescentes, des molécules luminescentes ou des particules de couleur peuvent être couplés à ces divers antigènes pour être utilisés comme conjugués. Des colloïdes métalliques peuvent également être utilisés. Par ailleurs, les antigènes d'excrétion sécrétion d'amastigotes ou de promastigotes de *Leishmania sp* et plus particulièrement la partie carboxyterminale de la Protein Surface Antigen sous forme purifiée ou protéine recombinante sont couplés à des grosses molécules de biotine, avidine, streptavidine ou tout autre protéine pour les rendre plus accessibles.

Ainsi, les anticorps d'isotype IgG2 selon l'invention peuvent être utilisés chez les mammifères comme marqueurs d'un état immunitaire de type à médiation cellulaire dépendante de lymphocytes T et préférentiellement de lymphocytes T de type Th1, comme marqueurs de la résistance à la leishmaniose et aux infections à micro-organismes pathogènes intracellulaires chez les mammifères, comme marqueurs de la vaccination immunoprophylactique et immunothérapeutique pour les infections à micro-organismes pathogènes intracellulaires, et comme effecteurs d'immunothérapie pour les leishmanioses et les infections à micro-organismes pathogènes intracellulaires.

## REVENTICATIONS

1. Immunoglobulines d'isotypes IgG particuliers spécifiques des antigènes d'excrétion sécrétion de promastigotes ou d'amastigotes de *Leishmania* sp caractérisées par leur utilisation comme marqueur d'une immunité à médiation cellulaire permettant notamment la mise en évidence d'une immunité à médiation cellulaire dépendante de lymphocytes T et préférentiellement de lymphocytes T de type Th1 chez les mammifères.
- 10 2. Immunoglobulines d'isotypes IgG particuliers spécifiques des antigènes d'excrétion sécrétion de promastigotes ou d'amastigotes de *Leishmania* sp caractérisées par leur utilisation comme marqueurs de la résistance à la leishmaniose et aux infections à micro-organismes pathogènes intracellulaires chez les mammifères.
- 15 3. Immunoglobulines d'isotypes IgG particuliers spécifiques des antigènes d'excrétion sécrétion de promastigotes ou d'amastigotes de *Leishmania* sp caractérisées par leur utilisation comme marqueurs de la vaccination immunoprophylactique et immunothérapeutique chez les mammifères pour les leishmanioses et les infections à micro-organismes pathogènes intracellulaires
- 20 4. Immunoglobulines d'isotypes IgG particuliers spécifiques des antigènes d'excrétion sécrétion de promastigotes ou d'amastigotes de *Leishmania* sp caractérisées en ce qu'elles ont utilisées comme effecteurs d'immunothérapie dans le cadre des leishmanioses et des infections à micro-organismes pathogènes intracellulaires chez les mammifères.
- 25 5. Immunoglobulines selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisées en ce qu'elles sont spécifiques de la *Protein Surface Antigen* des antigènes d'excrétion sécrétion des promastigotes ou des amastigotes de *Leishmania* sp.
- 30 6. Immunoglobulines selon la revendication 5 caractérisées en ce qu'elles sont spécifiques de la partie carboxyterminale de la *Protein Surface Antigen* des antigènes d'excrétion sécrétion des promastigotes ou des amastigotes de *Leishmania* sp.

## REVENTICATIONS

1. Immunoglobulines caractérisées en ce qu'elles sont des immunoglobulines d'isotypes IgG particuliers spécifiques des antigènes d'excrétion sécrétion de promastigotes ou d'amastigotes de *Leishmania sp*
2. Immunoglobulines selon la revendication 1 caractérisées en ce qu'elles sont spécifiques de la *Protein Surface Antigen* des antigènes d'excrétion sécrétion des promastigotes ou des amastigotes de *Leishmania sp*.
3. Immunoglobulines selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisées en ce qu'elles sont spécifiques de la partie carboxyterminale de la *Protein Surface Antigen* des antigènes d'excrétion sécrétion des promastigotes ou des amastigotes de *Leishmania sp*.
4. Immunoglobulines selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisées en ce qu'elles sont d'isotypes IgG<sub>2</sub> chez le chien et d'isotypes particuliers chez les autres mammifères, isotypes reliés à une immunité à médiation cellulaire dépendante des lymphocytes T de type Th1.
5. Immunoglobulines selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce qu'elles lysent les amastigotes et promastigotes de *Leishmania sp* in vitro et neutralisent leur prolifération.
6. Utilisation des immunoglobulines selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 comme marqueur d'une immunité à médiation cellulaire permettant notamment la mise en évidence d'une immunité à médiation cellulaire dépendante de lymphocytes T et préférentiellement de lymphocytes T de type Th1 chez les mammifères.
7. Utilisation des immunoglobulines selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 comme marqueurs de la résistance à la leishmaniose et aux infections à micro-organismes pathogènes intracellulaires chez les mammifères.
8. Utilisation des immunoglobulines selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 comme marqueurs de la vaccination immunoprophylactique et

7. Immunoglobulines selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisées en ce qu'elles sont d'isotypes IgG<sub>2</sub> chez le chien et d'isotypes particuliers chez les autres mammifères, isotypes reliés à une immunité à médiation cellulaire dépendante des lymphocytes T de type Th1.

8. Immunoglobulines selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisées en ce qu'elles lysent les amastigotes et promastigotes de *Leishmania sp* in vitro et neutralisent leur prolifération.

9. Produit de diagnostic in vitro caractérisé en ce qu'il détecte les immunoglobulines selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, et 5 à 8.

10. Kit de diagnostic in vitro comportant le produit de diagnostic selon la revendication 9 caractérisé en ce que les antigènes d'excrétion sécrétion d'amastigotes ou de promastigotes de *Leishmania sp* sont couplés à des grosses molécules de type biotine, avidine, streptavidine ou tout autre protéine pour les rendre plus accessibles.

11. Kit de diagnostic in vitro selon la revendication 10 caractérisé en ce que la partie carboxyterminale de la Protein Surface Antigen sous forme purifiée ou protéine recombinante des antigènes d'excrétion sécrétion d'amastigotes ou de promastigotes de *Leishmania sp* est couplée à des grosses molécules de type biotine, avidine, streptavidine ou tout autre protéine pour les rendre plus accessibles.

12. Kit de diagnostic in vitro caractérisé en ce que les antigènes d'excrétion sécrétion ou la partie carboxyterminale de la Protein Surface Antigen sont immobilisés à un support solide.

13. Kit de diagnostic in vitro selon la revendication 12 caractérisé en ce que les antigènes d'excrétion sécrétion ou la partie carboxyterminale de la Protein Surface Antigen sont immobilisés à des membranes de nitrocellulose ou autres polymères, des supports de latex, des matériaux de plastic ou des colloïdes métalliques.

immunothérapeutique chez les mammifères pour les leishmanioses et les infections à micro-organismes pathogènes intracellulaires

5 9. Utilisation des immunoglobulines selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 comme effecteurs d'immunothérapie dans le cadre des leishmanioses et des infections à micro-organismes pathogènes intracellulaires chez les mammifères.

10 10. Utilisation des immunoglobulines selon les revendications 1 à 5 pour un produit de diagnostic in vitro détectant un ou des épitopes portés par les extrémités NH<sub>2</sub> et COOH terminales de la Protein Surface Antigen excrétée sécrétée par *Leishmania* sp.

immunothérapeutique chez les mammifères pour les leishmanioses et les infections à micro-organismes pathogènes intracellulaires

9. Immunoglobulines selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 comme effecteurs d'immunothérapie dans le cadre des leishmanioses et des infections à micro-organismes pathogènes intracellulaires chez les mammifères.

10. Utilisation des immunoglobulines selon les revendications 1 à 5 pour un produit de diagnostic in vitro détectant un ou des épitopes portés par les extrémités NH<sub>2</sub> et COOH terminales de la Protein Surface Antigen excrétée sécrétée par *Leishmania sp.*

14. Kit de diagnostic in vitro caractérisé en ce que les antigènes d'excrétion sécrétion ou la partie carboxyterminale de la Protein Surface Antigen sont conjugués à des radio-isotopes, des molécules fluorescentes, des molécules luminescentes, des enzymes ou des particules de couleur.

5

15. Produit de diagnostic in vitro caractérisé par l'utilisation des immunoglobulines selon les revendications 1 à 8 pour détecter un ou des épitopes portés par les extrémités NH<sub>2</sub> et COOH terminales de la Protein Surface Antigen excrétée sécrétée par *Leishmania sp.*

10

1/3

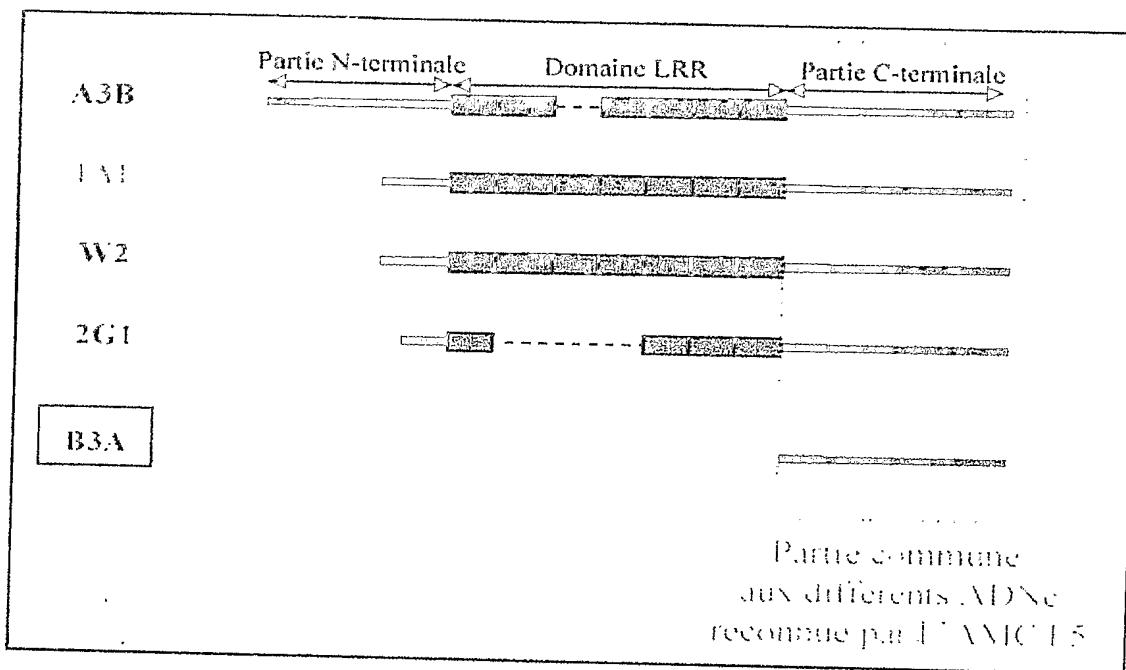


Figure 1

Fig 2: Analyse de la réponse humorale de patients et de chiens naturellement infectés vis à vis de la protéine recombinante 6-His)-COOH-PSA par western blot

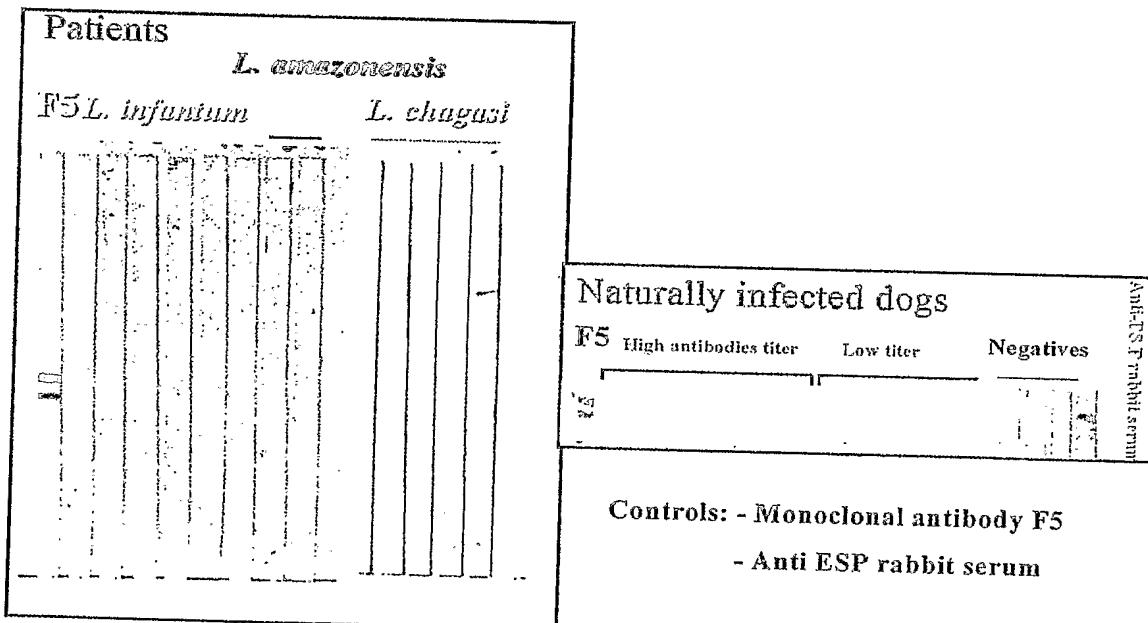


Figure 2

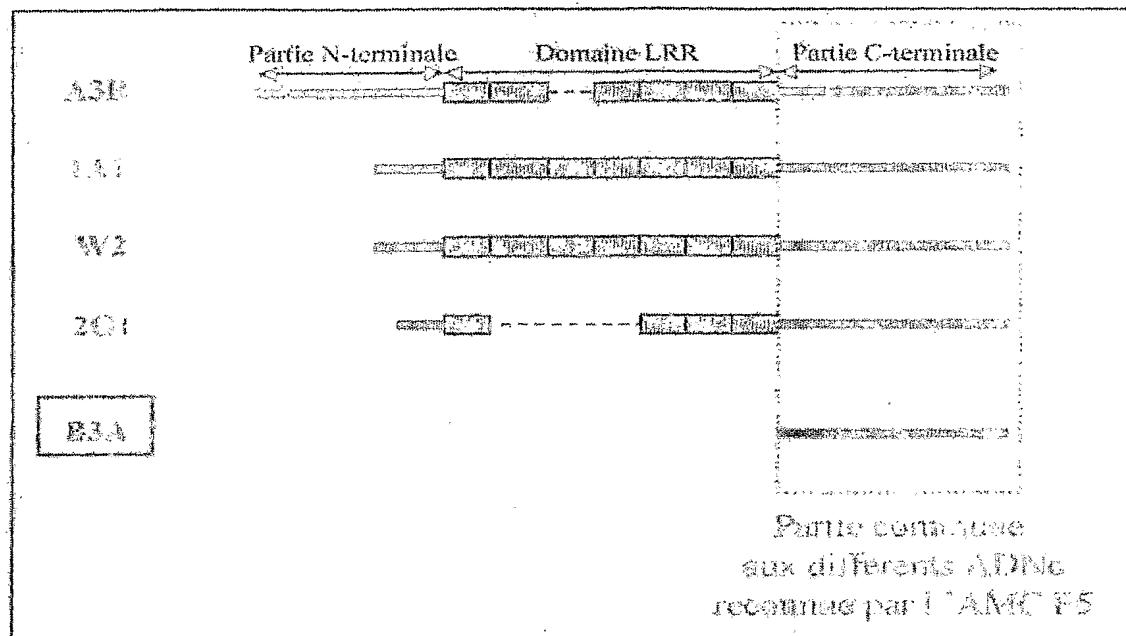


Figure 1

*Fig 2: Analyse de la réponse humorale de patients et de chiens naturellement infectés vis à vis de la protéine recombinante 6-His-COOH-PSA par western blot*

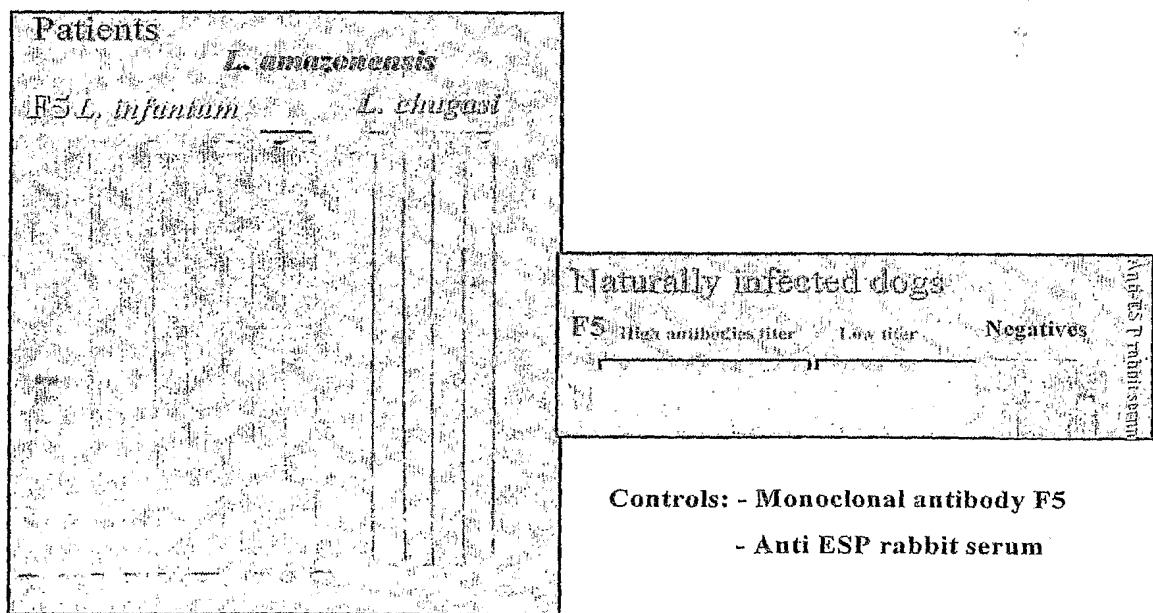
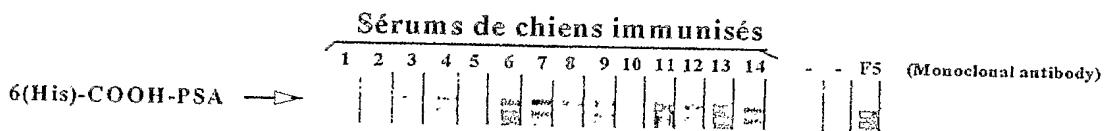


Figure 2

2/3

**Fig 3: Analyse de la réponse humorale de chiens immunisés par des AES de promastigote de *L. infantum* vis à vis de la protéine recombinante 6(His)-COOH-PSA par Western Blot**



La réponse humorale de chiens immunisés par des AES de formes promastigotes de *L. infantum* cible un/des épitope(s) porté(s) par la partie carboxyterminale de la PSA excrétée sécrétée

Chien 4      Chien 6      Chien 7  
 a b c      a b c      a b c

Cette réponse implique des anticorps d'isotype IgG2  
 a : IgG totale  
 b : IgG1  
 c : IgG2

Figure 3

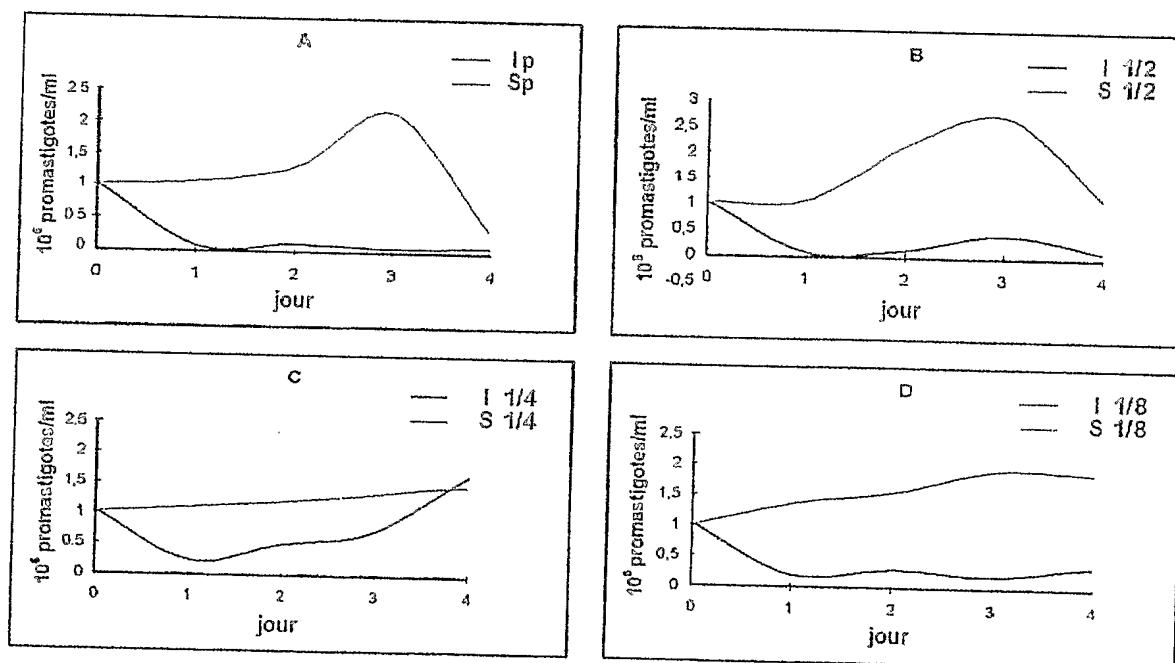
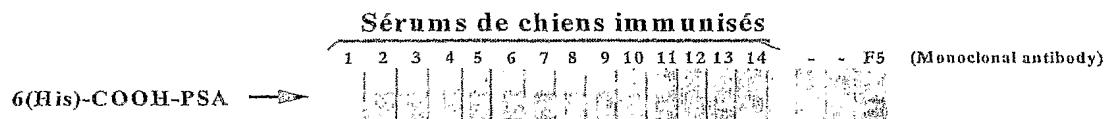


Figure 4

**Fig 3: Analyse de la réponse humorale de chiens immunisés par des AES de promastigote de *L. infantum* vis à vis de la protéine recombinante 6(His)-COOH-PSA par Western Blot**



La réponse humorale de chiens immunisés par des AES de formes promastigotes de *L. infantum* cible un/des épitope(s) porté(s) par la partie carboxyterminale de la PSA excrétée sécrétée

Chien 4      Chien 6      Chien 7

a b c      a b c      a b c

Cette réponse implique des anticorps d'isotype IgG2

a : IgG totale  
 b : IgG1  
 c : IgG2

Figure 3

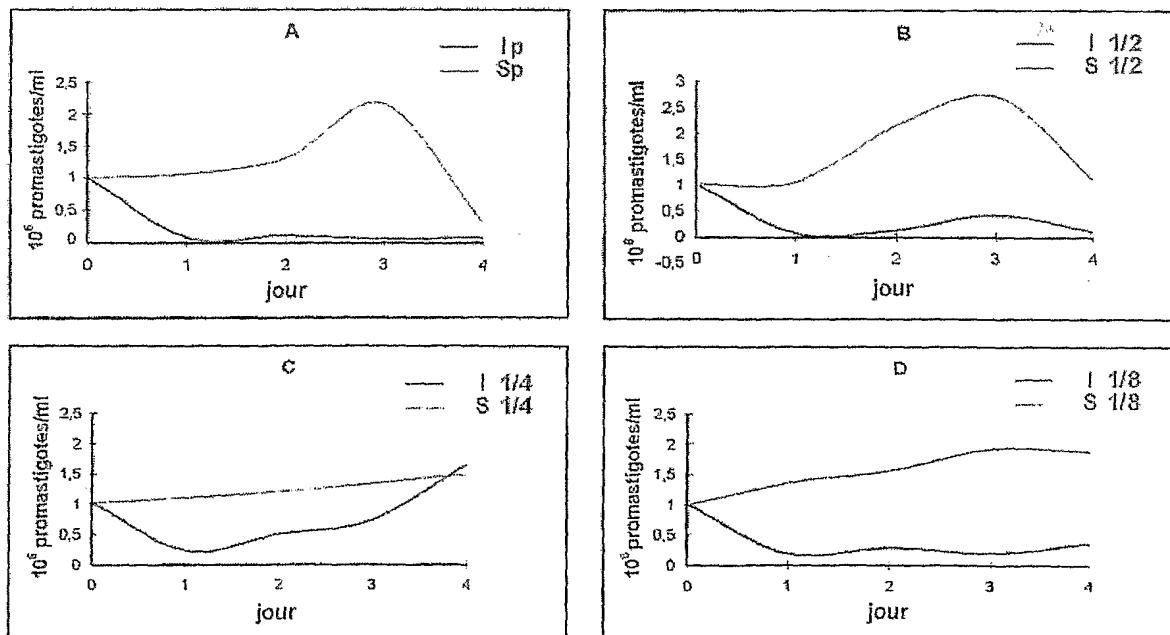


Figure 4

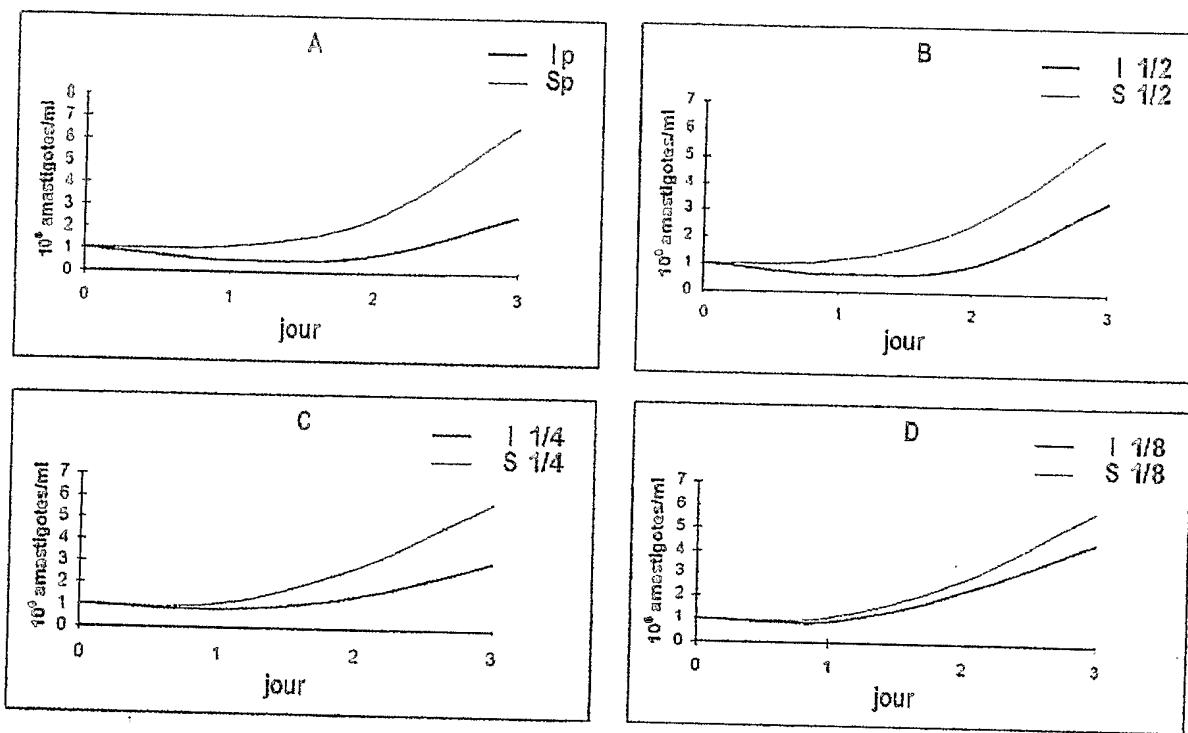


Figure 5

## BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

## DÉPARTEMENT DES BREVETS

 26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
 75800 Paris Cedex 08  
 Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

## DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° . . . / . . .

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

INV

DB 113 6 W / 200001

Vos références pour ce dossier (facultatif)	B118 12FR 4
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0109566
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)	
Anticorps d'isotypes particuliers anti antigènes d'excrétion sécrétion de promastigotes ou d'amastigotes de Leishmania sp	

## LE(S) DEMANDEUR(S) :

 BIO VETO TESTS, en abrégé BVT  
 (SARL)  
 285, avenue de Rome - Parc d'Activité Les Playes  
 Jean Monnet Sud  
 83500 LA SEYNE SUR MER

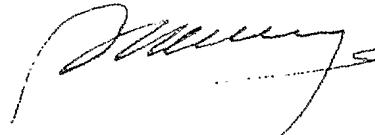
## DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	PAPIEROK
Prénoms		Gérard
Adresse	Rue	Résidence Reine Victoria 38, avenue Riondet
	Code postal et ville	18 3 4 0 0 HYERES
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	VICENS
Prénoms		Serge
Adresse	Rue	15 Allée du Collet de Lèbre
	Code postal et ville	11 3 1 8 0 GIGNAC LA NERTHE
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	LEMESRE
Prénoms		Jean-Loup
Adresse	Rue	138, avenue de Lodève Bâtiment 6 - 1D - Résidence Beau Soleil
	Code postal et ville	13 4 0 0 0 MONTPELLIER
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

 DATE ET SIGNATURE(S)  
 DU (DES) DEMANDEUR(S)  
 OU DU MANDATAIRE  
 (Nom et qualité du signataire)

 26 Juillet 2002  
 Pierre MAREK : Mandataire



PCT Application  
**FR0302358**

